

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. April 2004 (01.04.2004)

PCT

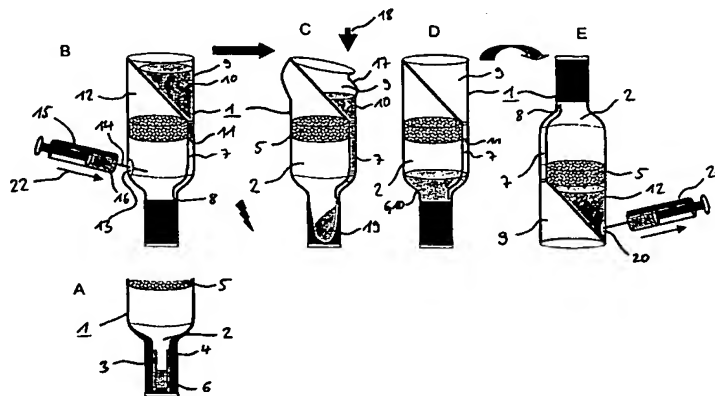
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/027015 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M 1/42, C12N 13/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003042
- (22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2003 (12.09.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 43 086.1 16. September 2002 (16.09.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): AMAXA GMBH [DE/DE]; Nattermannallee 1, 50829 Köln (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIEBENKOTTEN, Gregor [DE/DE]; Sankt-Magdalenen-Strasse 69, 50226 Frechen-Königsdorf (DE). MÜLLER-HARTMANN, Herbert [DE/DE]; Klarastrasse 27, 50823 Köln (DE). RIEMEN, Gudula [DE/DE]; Pater-Kolbe-Weg 7, 40764 Langenfeld (DE). KRAUS, Günter [DE/DE]; Ludwig-Richter-Strasse 41, 50529 Pulheim (DE).
- (74) Anwalt: REMUS, Alvaro; Mörsenbroicher Weg 200, 40470 Düsseldorf (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR PROCESSING BIOLOGICAL MATERIAL

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON BIOLOGISCHEM MATERIAL



(57) Abstract: The invention relates to a device for processing biological material, which is made of at least one chamber which can be closed at least in relation to the outside comprising an inner area for receiving the biological material. The chamber comprises at least one electrode which is placed in contact with the inner area of the chamber and is provided for producing an electric field. The invention also relates to a method for processing biological material, wherein the biological material is arranged in the inner area of a chamber which can be closed at least in relation to the outside comprising at least one electrode which is placed in contact with the inner area of the chamber and is provided for producing an electric field which is produced after introducing the biological material into the inner area and by applying voltage to an electrode and a further electrode which is in contact with the inner area of the chamber. The chamber comprises at least one supply line which has at least one opening arranged close to the electrode. According to the inventive method, the biological material is almost completely rinsed out of the inner area of the chamber by means of a solution after the electric field is produced, said solution being guided via a supply line of the chamber to at least one electrode.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Behandlung von biologischem Material, zumindest bestehend aus einer nach aussen zumindest verschliessbaren Kammer mit einem Innenraum zur Aufnahme des biologischen Materials, wobei die Kammer zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

ist. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Behandlung von biologischem Material, bei dem das biologische Material in den Innenraum einer nach aussen zumindest verschliessbaren Kammer eingebracht wird, welche zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist, welches nach dem Einbringen des biologischen Materials in dem Innenraum erzeugt wird durch Anlegen einer Spannung an die Elektrode und eine weitere mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt stehende Elektrode. Die Kammer weist erfindungsgemäss zumindest eine Zuleitung auf, welche in räumlicher Nähe zu der Elektrode mindestens eine Öffnung aufweist. Bei dem erfindungsgemässen Verfahren wird nach dem Erzeugen des elektrischen Feldes das biologische Material mittels einer Lösung, die über eine Zuleitung der Kammer an zumindest einer Elektrode entlang geleitet wird, annähernd vollständig aus dem Innenraum der Kammer ausgespült.

Vorrichtung und Verfahren zur Behandlung von biologischem Material

Hintergrund der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Behandlung von biologischem Material, zumindest bestehend aus einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer mit einem Innenraum zur Aufnahme des biologischen Materials, wobei die Kammer zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Behandlung von biologischem Material, bei dem das biologische Material in den Innenraum einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer eingebracht wird, welche zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist, welches nach dem Einbringen des biologischen Materials in dem Innenraum erzeugt wird durch Anlegen einer Spannung an die Elektrode und eine weitere mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt stehende Elektrode.

Stand der Technik

Das Einbringen biologisch aktiver Moleküle, wie beispielsweise DNA, RNA oder Proteine, in lebende Zellen stellt ein wichtiges Instrument zur Untersuchung biologischer Funktionen dieser Moleküle dar. Eine bevorzugte Methode zum Einbringen von Fremdmolekülen in die Zellen ist dabei die Elektroporation, welche im Gegensatz zu chemischen Methoden nicht auf den gleichzeitigen Transport anderer biologisch aktiver Moleküle angewiesen ist. Bei der Elektroporation werden die Fremdmoleküle aus einer an die Zellen angepassten Pufferlösung oder einem Zellkulturmedium durch einen kurzzeitigen Stromfluss in die Zellen eingebracht, wobei durch die Wirkung der kurzen elektrischen Impulse die

Zellmembran für die Fremdmoleküle durchlässig gemacht wird. Die Zellsuspension befindet sich dabei häufig in einer sogenannten Küvette, d.h. einem schmalen, nach oben offenen Gefäß, das in der Nähe ihres Bodens zwei gegenüberliegende, parallele Elektroden in den Seitenwänden aufweist, welche zum Anlegen der elektrischen Spannung dienen. Durch die kurzzeitig entstehenden „Poren“ in der Zellmembran gelangen die biologisch aktiven Moleküle zunächst in das Zytoplasma, in dem sie ggf. bereits ihre zu untersuchende Funktion ausüben können, und daraufhin unter bestimmten Bedingungen auch in den Zellkern.

Durch das kurzzeitige Anlegen eines starken elektrischen Feldes, d.h. eines kurzen Pulses mit hoher Stromdichte, können darüber hinaus auch Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel fusioniert werden. Bei dieser sogenannten Elektrofusion werden die Zellen beispielsweise zunächst durch ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld in engen Membrankontakt gebracht. Durch das anschließende Anlegen eines elektrischen Feldpulses kommt es dann zur Interaktion von Membranteilen, die schließlich zur Fusion führt. Für die Elektrofusion können dabei vergleichbare apparative Vorrichtungen verwendet werden, wie für die Elektroporation.

Vorrichtungen der eingangs genannten Art sind bekannt und werden vor allem bei der Elektroporation oder Elektrofusion in Form von Küvetten mit eingelegten Elektroden aus Metall eingesetzt. Die für diesen Zweck verwendeten Behälter sind meist schmale, nach oben offene Gefäße, deren Innenraum aus jeweils zwei Paaren parallel und gegenüberliegend angeordneter Seitenwände gebildet wird. Der Innenraum dient dabei der Aufnahme der Zellsuspension, d.h. in der Regel einer wässrigen Pufferlösung oder eines Zellkulturmediums, in dem die zu behandelnden Zellen suspendiert sind. Zum Anlegen einer elektrischen Spannung weisen solche Küvetten zumeist im unteren Bereich eines Paares gegenüberliegender Seitenwände ein Elektrodenpaar auf. Bei einer elektrischen Entladung fließt zwischen den beiden Elektroden ein elektrischer Strom durch die

Zellsuspension, der einen Transport der Nukleinsäuren oder anderer Moleküle in die Zellen bewirkt oder je nach den gewählten Bedingungen zur Zellfusion führt. Die Elektroden bestehen dabei zumeist aus Metall, wobei häufig Aluminium verwendet wird.

Aus der DE 33 21 239 C2 ist beispielsweise eine Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt, die einen Innenraum zur Aufnahme einer lebende Zellen enthaltenden Suspension aufweist, in den wenigstens zwei Elektroden hineinragen. Die Elektroden dienen wie üblich dem Anlegen einer Spannung zur Erzeugung eines elektrischen Feldes zwischen den Elektroden, wobei die Zellen diesem elektrischen Feld ausgesetzt sind. Die Kammer ist zwar für die Fusion von Zellen vorgesehen, kann aber ebenso für das Einschleusen von Nukleinsäuren in die Zellen, d. h. die sogenannte Elektroporation, verwendet werden. Der Innenraum der Kammer ist allseitig hermetisch verschlossen, wobei ein Bereich der den Innenraum umgebenden Wandung mittels einer Nadel oder Kanüle perforierbar ist. So kann die Wandung teilweise aus einer perforierbaren Folie aus Acetylcellulose bestehen. Durch diese perforierbare Folie kann die Zellsuspension in die Kammer eingefüllt und aus dieser wieder entnommen werden. Dies hat den Vorteil, dass die Behandlung der Zellen unter sterilen Bedingungen erfolgen kann. Die Kammer kann allerdings nach der Behandlung der Zellen nur sehr umständlich und mit unbefriedigendem Ergebnis ausgespült werden, so dass stets ein nicht unerheblicher Teil der behandelten Zellen im Innenraum der Kammer verbleibt.

Aus der DE 33 17 415 C2 ist ferner eine Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt, bei welcher der Innenraum von einem Innenkörper und einer den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem Abstand umschließenden Außenhülle begrenzt ist. Die in den Innenraum hineinragenden Elektroden umgeben den Innenkörper dabei in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung. Zum Einbringen der Zellsuspension in die

Kammer weist diese eine verschließbare Zuleitung und zur Entnahme der Zellsuspension eine verschließbare Ableitung auf. Diese Kammer kann folglich auch als Durchflussskammer verwendet werden, indem eine vorbestimmte Menge der Zellsuspension in die Kammer gedrückt oder gesaugt wird, anschließend die elektrische Behandlung vorgenommen wird und schließlich die in der Kammer befindliche Zellsuspension aus der Kammer gedrückt oder gesaugt und durch eine neue Menge an Zellsuspension ersetzt wird. Nach der elektrischen Behandlung der Zellen kann der Innenraum mit einer Reinigungslösung durchgespült werden, wobei die Reinigungslösung über ein Porensystem in den Innenraum gedrückt werden kann. Ein effektives Durchspülen der Kammer nach der elektrischen Behandlung der Zellen ohne Verwendung einer Reinigungslösung, d. h. unter Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen, ist aber auch hier nicht möglich, da die Lösung nicht mit hoher Fließgeschwindigkeit an der gesamten Oberfläche der Elektroden vorbeifließen kann.

Aus der DE 35 22 610 C2 ist eine weitere Kammer für die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt, bei der die den Innenraum zur Aufnahme der Zellsuspension bildenden Wände aus einer innenliegenden und einer außenliegenden Elektrode bestehen. Die Kammer weist eine durch einen Stopfen verschlossene Öffnung zum Einfüllen der Zellsuspension und eine Ausfüllöffnung zum Entnehmen der behandelten Zellen auf. Mittels einer Pipette kann dabei eine dosierte Menge der Zellsuspension in den Innenraum eingefüllt und anschließend elektrisch behandelt werden. Durch Einfüllen einer weiteren genau dosierten Lösungsmenge wird die behandelte Zellsuspension dann nach unten durch die Ausfüllöffnung aus dem Innenraum gedrückt. Aufgrund der Geometrie der Kammer und der Anordnung der Elektroden in Form einer innenliegenden und einer außenliegenden Elektrode ist aber auch hier ein Ausspülen der behandelten Zellen mit hoher Fließgeschwindigkeit nicht möglich.

Die US 4,849,089 beschreibt eine Kammer zur elektrischen Behandlung von Vesikeln, die durch eine kreisförmige Einfassung gebildet ist. Der Innenraum der Kammer zur Aufnahme der Zellsuspension wird durch einen von der Einfassung beabstandeten inneren Ring gebildet. Das zwischen der Einfassung und dem inneren Ring liegende isolierende Material ist von zwei Kanälen durchbrochen, die den Innenraum von außen zugänglich machen. Über diese Kanäle kann die Zellsuspension in den Innenraum eingefüllt und wieder entnommen werden. Die Elektroden bestehen jeweils aus kreisförmigen Platten, die von oben und von unten in die Einfassung eingelegt werden und den Boden bzw. den Deckel des Innenraums bilden. Aufgrund der kreisförmigen Geometrie des Innenraums und der oben bzw. unten liegenden Elektroden ist ein effektives Durchspülen und somit vollständiges Ausspülen der behandelten Zellen bei dieser Vorrichtung ebenfalls nicht möglich.

Die bisher bekannten Vorrichtungen und Verfahren zur Elektroporation und Elektrofusion haben den Nachteil, dass die behandelten Zellen oder Vesikel der Kammer nur unvollständig, d. h. mit relativ hohem Verlust an biologischem Material, wieder entnehmbar sind. Insbesondere, wenn die verwendeten Spannungspulse eine sehr hohe Feldstärke aufweisen, d. h. das elektrische Feld eine hohe Stromdichte aufweist, lagert sich häufig Zellmaterial an den Elektroden, vor allem an der Kathode, ab. Darüber hinaus kommt es häufig zu einer starken Gasentwicklung, die zur Schaumbildung führt, was ebenfalls ein vollständiges Entnehmen der behandelten Zellen erschwert.

Zusammenfassung der Erfindung

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung und ein Verfahren der eingangs genannten Art zu schaffen, welche die vorgenannten Nachteile vermeiden und eine möglichst vollständige Rückgewinnung der behandelten Zellen aus einer nach außen verschlossenen Kammer ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe hinsichtlich der Vorrichtung dadurch gelöst, dass die Kammer zumindest eine Zuleitung aufweist, welche in räumlicher Nähe zu der Elektrode mindestens eine Öffnung aufweist. Durch diese besondere Anordnung kann der Innenraum der Kammer, auch in geschlossenem Zustand und unter sterilen Bedingungen, sehr effektiv gespült werden, wobei insbesondere der kritische Bereich der Elektrode zunächst von der Lösung umspült wird. Hierdurch kann an den inneren Oberflächen der Kammer anheftendes biologisches Material sehr effektiv abgelöst werden, was zu einer nahezu vollständigen Rückgewinnung des eingesetzten Materials führt. Dies ist vor allem bei Anwendungen von Vorteil, bei denen kostbares, nur in begrenzten Mengen verfügbares Material verwendet wird.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Zuleitung kanalförmig ausgebildet ist, d. h. einen im Verhältnis zu ihrer Längserstreckung geringen Querschnitt aufweist. Durch eine solche Ausgestaltung kann eine hohe Fließgeschwindigkeit in der Zuleitung und damit auch an deren Öffnung erreicht werden.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung kann sich der innere Durchmesser der Zuleitung in Richtung der Elektrode verringern, was ebenfalls zu einer hohen Fließgeschwindigkeit an der Öffnung der Zuleitung und damit zu einem effektiven Spülvorgang führt. Die Verringerung des Durchmessers kann dabei allmählich und gleichmäßig über die gesamte Länge der Zuleitung erfolgen oder aber auf den Bereich in der Nähe der Öffnung beschränkt sein. Im letzteren Fall kann die Öffnung beispielsweise auch düsenartig ausgebildet sein.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass mindestens ein durch eine Wandung gebildetes Behältnis zur Aufnahme einer Lösung über die Zuleitung mit dem Innenraum zumindest verbindbar ist. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn die Behandlung der Zellen nicht in einem Zellkulturmedium,

sondern in einer für die elektrische Behandlung optimierten Pufferlösung durchgeführt wird. In diesem Fall ist es notwendig, die Pufferlösung kurz nach Abschluss der Behandlung mit einer Lösung zu verdünnen, die für die Zellen geeignet ist. Durch die direkte Verbindbarkeit des Behältnisses mit dem Innenraum ist sichergestellt, dass die Verdünnung der bei der Behandlung verwendeten Pufferlösung schnell und unkompliziert erfolgen kann.

Das Behältnis mit der Lösung zum Spülen der Kammer kann mit dem Innenraum verbunden werden, wobei der Innenraum der Kammer und das Behältnis durch eine Trenneinheit, durch welche die Lösung selektiv in den Innenraum der Kammer einbringbar ist, voneinander getrennt sein können. Dies ist vor allem dann von Vorteil, wenn das Behältnis mit dem Innenraum fest verbunden ist, da die Lösung erst dann in diesen gelangen soll, wenn die Behandlung der Zellen abgeschlossen ist. Die Trenneinheit kann dabei in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ein Ventil oder eine fragile, unter Druck zerstörbare Membran sein. Durch diese Ausgestaltung kann die Kammer durch einfache Manipulation von außen gespült werden, was vor allem bei Anwendungen unter sterilen Bedingungen von Bedeutung ist.

Für klinische Anwendungen, die unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, ist vorgesehen, dass die Kammer nach außen zumindest keimdicht verschlossen ist. Wenn die Kammer als geschlossene Einheit transportiert werden und beispielsweise eine vorgelegte Pufferlösung, beispielsweise mit gelösten biologisch aktiven Molekülen, enthalten soll, so kann die Kammer zusätzlich noch flüssigkeits- und/oder gasdicht verschlossen sein.

Die das Behältnis bildende Wandung kann in einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung zumindest teilweise aus einem elastischen und/oder deformierbaren Material bestehen. Hierdurch kann auf die Lösung im Behältnis von außen ein Druck ausgeübt werden, so dass die Lösung mit hoher

Fliessgeschwindigkeit in die Zuleitung strömen kann. Wird die Lösung dagegen in alternativer Ausführung mittels Unterdruck aus dem Behältnis gesaugt, so kann die Wandung entsprechend der ausströmenden Lösung nachgeben.

Das Behältnis kann erfindungsgemäß an die Kammer zumindest anschließbar sein. Beispielsweise kann das Behältnis einstückig mit der Kammer verbunden sein, so dass beide als Einheit transportiert und verwendet werden können. Es kann aber auch über eine Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer anschließbar sein, so dass beide getrennt voneinander transportiert und aufbewahrt werden können. Im letzteren Fall können beispielsweise auch unterschiedliche Behältnisse, die beim Anwender bereits vorhanden sind, mit der erfindungsgemäßen Kammer verwendet werden. In einer vorteilhaften Ausführungsform bilden die Kammer und das Behältnis eine nach außen zumindest keimdicht verschlossene Einheit.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Kammer zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle, perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich aufweist und/oder mit zumindest einem Zugang mit einer Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen ist. Über den derart ausgebildeten Wandbereich oder eine besondere Anschlussvorrichtung ist es beispielsweise möglich, eine Zellsuspension oder anderes biologisches Material unter sterilen Bedingungen in den Innenraum der Kammer einzubringen.

Wenn die Kammer einen geringen Querschnitt aufweist und/oder schlangenförmig und/oder spiralförmig ausgebildet ist, führt dies zu einer hohen Fliessgeschwindigkeit der Lösung im Innenraum, so dass die Rückgewinnung des biologischen Materials weiter verbessert werden kann.

In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung kann die Kammer durch mindestens eine Trenneinrichtung in mehrere Teilbereiche unterteilt sein. Dabei kann die Trenneinrichtung aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit bestehen.

Zur Aufnahme des behandelten biologischen Materials ist vorgesehen, dass ein Behälter an eine Ausgangsöffnung der Kammer zumindest anschließbar ist, d.h. beispielsweise entweder einstückig mit dieser verbunden oder über eine Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer anschließbar ist. Dabei kann zwischen der Kammer und dem Behälter eine Trennvorrichtung angeordnet sein. Die Trennvorrichtung besteht vorzugsweise aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit. Das Filtermaterial ist dabei zweckmäßigerweise so zu wählen, dass das behandelte biologische Material durchgelassen, größere Partikel und Komplexe aber zurückgehalten werden. Auf diese Weise wird vermieden, dass störende, bei der elektrischen Behandlung entstandene Bestandteile in das Endprodukt gelangen, was vor allem bei klinischen Anwendungen von Bedeutung ist.

Der Behälter weist in einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle, perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich auf. Er kann aber alternativ auch mit zumindest einem Ausgang mit einer Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen sein. In beiden Fällen ist die einfache und sterile Entnahme des behandelten biologischen Materials aus dem Behälter möglich. Der Behälter kann beispielsweise auch eine Spritze oder ein Infusionsbeutel sein, so dass das behandelte biologische Material beispielsweise bei klinischen Anwendungen der zu behandelnden Person direkt appliziert werden kann.

Behälter und Kammer können ferner eine nach außen keimdicht verschlossene Einheit bilden und somit gemeinsam transportiert und gelagert werden.

Der perforierbare, selbstverschließende Wandbereich der Kammer und/oder des Behälters besteht vorteilhafterweise aus einem Kunststoffmaterial, beispielsweise einem Silicon, einem Elastomer, Gummi oder einer Kunststofffolie. Die Kunststofffolie kann beispielsweise aus Acetylcellulose bestehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die Kammer zwei gegenüberliegende Elektroden aufweist, die jeweils mit dem Innenraum in Kontakt stehen. Alternativ kann zusätzlich zu der in dem Innenraum angeordneten Elektrode auch eine weitere Elektrode in den Innenraum der Kammer eingeführt werden.

Die Elektrode oder die Elektroden bestehen besonders bevorzugt aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial, vorzugsweise einem mit einem leitfähigen Material dotierten Kunststoff, so dass keine für lebende Zellen toxischen Metall-Ionen aus den Elektroden austreten können. Dies wirkt sich bei der Behandlung von lebenden Zellen, insbesondere eukaryontischen Zellen, vorteilhaft auf die Überlebensrate der Zellen aus.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe hinsichtlich des Verfahrens dadurch gelöst, dass nach dem Erzeugen des elektrischen Feldes das biologische Material mittels einer Lösung, die über eine Zuleitung der Kammer an zumindest einer Elektrode entlang geleitet wird, annähernd vollständig aus dem Innenraum der Kammer ausgespült wird. Hierdurch kann an den inneren Oberflächen der Kammer anhaftendes biologisches Material, insbesondere im Bereich der Elektrode, sehr effektiv abgelöst werden, was zu einer nahezu vollständigen Rückgewinnung des eingesetzten Materials führt.

Dabei ist von Vorteil, wenn die Lösung mit hoher Fließgeschwindigkeit an der Elektrode entlang geleitet wird.

Da sich biologisches Material, insbesondere lebende Zellen, bevorzugt an der Kathode ablagern bzw. anheften, ist in vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, dass die Lösung zunächst an der Kathode entlang geleitet wird.

In einer Ausgestaltung des Verfahrens ist ferner vorgesehen, dass das biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich in den Innenraum der Kammer eingebracht wird.

In vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass eine Trenneinheit, die den Innenraum der Kammer von einem die Lösung enthaltenden Behältnis trennt, durch mechanische Manipulation von außen geöffnet wird, wobei das Behältnis durch die Zuleitung mit der Kammer verbindbar oder verbunden ist. Auf diese Weise können die Lösung und die Kammer gemeinsam transportiert und aufbewahrt werden, ohne dass die Lösung ungewollt in den Innenraum gelangt. Das Spülen des Innenraums erfolgt also selektiv und kann in vorteilhafter Weise unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Darüber hinaus kann die Lösung sehr kurzfristig nach der elektrischen Behandlung in den Innenraum eingebracht werden, so dass ggf. eine auf die elektrische Behandlung optimierte Pufferlösung, die für das biologische Material weniger geeignet ist, schnell durch die Lösung verdünnt werden kann. Die Trenneinheit kann dabei ein Ventil, welches durch die mechanische Manipulation von außen zumindest in eine Richtung geöffnet wird, oder eine fragile Membran sein, die durch von außen ausgeübten Druck zerstört wird. Die fragile Membran besteht vorzugsweise aus einem Kunststoffmaterial, beispielsweise aus Polyvinyl, Polyester, Polyethylen oder Cellulosefolien. Das Kunststoffmaterial kann dabei mit Fluorohalocarbon beschichtet sein, das sich durch eine geringe Wasserdampfdurchlässigkeit bei guter mechanischer Zerstörbarkeit auszeichnet.

In vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens ist ferner vorgesehen, dass das biologische Material und die Lösung in einen Behälter aufgenommen werden, der an eine Ausgangsöffnung der Kammer zumindest anschließbar ist. In diesem Behälter kann das behandelte Material dann der weiteren Verwendung auf einfache Weise direkt zugeführt werden.

In weiterer Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass ein die Lösung enthaltendes Behältnis zumindest teilweise durch eine elastische und/oder deformierbare Wandung gebildet ist und auf diese Wandung von außen ein Druck ausgeübt werden kann. Auf diese Weise wird die Lösung unter Druck in die Kammer gespült, was zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Verfahrens beiträgt. Der ausgeübte Druck kann ferner vorteilhafterweise dazu führen, dass die Trenneinheit, die den Innenraum der Kammer von dem die Lösung enthaltenden Behältnis trennen kann, geöffnet wird, so dass die Trennung auf einfache Weise und unter sterilen Bedingungen durchbrochen werden kann.

Das biologische Material kann ferner mit der Lösung aus dem Behältnis durch eine zwischen der Kammer und dem Behälter angeordnete Trennvorrichtung, insbesondere ein Ventil und/oder eine Filtereinheit, in den Behälter gespült werden, so dass der Spülvorgang selektiv und/oder unter Entfernung störender Bestandteile durchgeführt werden kann.

Insbesondere bei klinischen Anwendungen kann es vorteilhaft sein, wenn das behandelte biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich des Behälters aus diesem entnommen wird. Hierdurch wird die erforderliche Sterilität gewährleistet und ferner eine einfache und unmittelbare Verwendbarkeit des behandelten Materials sichergestellt.

In alternativer Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass das biologische Material lebende Zellen, vorzugsweise eukaryontische Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel sind, in welche durch das Erzeugen des elektrischen Feldes biologisch aktive Moleküle, vorzugsweise Nukleinsäuren, eingebracht werden, oder die durch das Erzeugen des elektrischen Feldes fusioniert werden.

Die biologisch aktiven Moleküle können bereits in einer Pufferlösung gelöst sein und vor dem Einbringen des biologischen Materials, vorzugsweise bereits bei der Herstellung einer verwendbaren Kammer, in den Innenraum der Kammer eingebracht werden, was das Verfahren für den Anwender deutlich vereinfacht, da dieser lediglich noch das biologische Material zugeben muss.

In Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in lebende Zellen, insbesondere direkt in den Zellkern, mit einer Stromdichte von bis zu 120 A/cm^2 , vorzugsweise 80 A/cm^2 , und/oder durch einen Spannungsimpuls mit einer Feldstärke von 2 bis 10 kV*cm^{-1} und einer Dauer von 10 bis $200 \mu\text{s}$ erreicht wird.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in die Zellen durch einen auf den Spannungsimpuls ohne Unterbrechung folgenden Stromfluss mit einer Stromdichte von 2 bis 14 A/cm^2 , vorzugsweise 5 A/cm^2 , und einer Dauer von 1 bis 100 ms, vorzugsweise 50 ms, erreicht wird.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Die Erfindung wird im weiteren anhand der Figuren beispielhaft näher erläutert.

Es zeigt

- Figur 1 Seitenansichten einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in teilweise perspektivischer und teilweise geschnittener Darstellung, jeweils für unterschiedliche Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens,
- Figur 2 eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in zwei geschnittenen Darstellungen, die jeweils zueinander um 90 Grad gedreht sind,
- Figur 3 eine Vorderansicht einer weiteren Ausführungsform der Erfindung in geschnittener Darstellung,
- Figur 4 eine Seitenansicht der Ausführungsform gemäß Figur 3 in geschnittener Darstellung,
- Figur 5 eine geschnittene Vorderansicht einer weiteren Alternative der erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- Figur 6 eine geschnittene Ansicht eines Teils einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit schlangenförmiger Kammer,
- Figur 7 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der Erfindung mit u-förmiger Kammer und
- Figur 8 eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung.

Beschreibung der Erfindung

Figur 1 zeigt Seitenansichten einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in teilweise perspektivischer und teilweise geschnittener Darstellung. Bei dieser besonders vorteilhaften Ausführungsform stellt die erfindungsgemäße Vorrichtung eine allseitig keim- und flüssigkeitsdicht verschlossene Einheit dar, die eine Behandlung der Zellen unter optimalen sterilen Bedingungen ermöglicht.

Figur 1a zeigt den unteren Bereich einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in geschnittener Darstellung. Dieser Bereich der Vorrichtung besteht aus einer Kammer 1, die einen Innenraum 2 aufweist, der zur Aufnahme von biologischem Material, beispielsweise einer Suspension lebender Zellen, vorgesehen ist. In dem Innenraum 2 sind zwei planparallel eingelegte Elektroden 3, 4 angeordnet, die den Innenraum 2 im unteren Bereich der Kammer 1 an zwei Seitenflächen begrenzen. Im oberen Bereich weist die Kammer eine hier nur teilweise dargestellte Filtereinheit 5 auf, welche den Innenraum 2 gegenüber einem anderen Bereich der Vorrichtung abgrenzt. In dem Innenraum 2 kann beispielsweise eine Pufferlösung 6 enthalten sein, in der biologisch aktive Moleküle, beispielsweise Nukleinsäuren, gelöst sein können. Für Anwendungen in der Gentherapie können so beispielsweise in der Pufferlösung 6 gelöste DNA-Moleküle bereits in der Kammer enthalten sein. Der Anwender braucht dann lediglich die einem Patienten entnommenen Zellen in den Innenraum 2 der Kammer 1 einzufüllen und dann die DNA durch das Erzeugen eines elektrischen Feldes in die Zellen einzubringen.

Figur 1b zeigt eine perspektivische Seitenansicht der erfindungsgemäßen Vorrichtung gemäß Figur 1a, wobei die Vorrichtung hier gegenüber der Figur 1a um 90 Grad gedreht dargestellt ist. Die Elektrode 3 verdeckt in dieser Darstellung den Einblick in den unteren Bereich des Innenraums 2. In dieser Darstellung wird deutlich, dass die Kammer 1 eine Zuleitung 7 aufweist, deren Öffnung 8 in

unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Elektroden 3, 4 angeordnet ist. Die Kammer 1 ist einstückig mit einem Behältnis 9 verbunden, welches eine Lösung 10 zum Ausspülen des Innenraums 2 der Kammer 1 enthält. Die Kammer 1 und das Behältnis 9 sind durch eine Trenneinheit 11 von einander getrennt. Bei dieser Trenneinheit 11 kann es sich beispielsweise um einen ventilartigen Verschluss oder eine fragile Membran handeln. Die Kammer 1 ist darüber hinaus einstückig mit einem Behälter 12 verbunden, der durch die Filtereinheit 5 vom Innenraum 2 der Kammer 1 getrennt ist. Der Behälter 12 und das Behältnis 9 bilden jeweils mit der Kammer 1 eine nach außen keim- und flüssigkeitsdicht verschlossene Einheit. Die Kammer 1 weist ferner einen perforierbaren Wandbereich 13 auf, durch den die Kanüle 14 einer Spritze 15 in den Innenraum 2 eingeführt werden kann. Die Spritze 15 kann beispielsweise eine Suspension 16 mit lebenden Zellen enthalten, die über die Kanüle 14 in den Innenraum 2 eingespritzt werden können. Durch Ausüben eines Druckes entlang der Richtung des Pfeils 22 wird die Zellsuspension in den Innenraum 2 gedrückt und steht somit für die nachfolgende elektrische Behandlung zur Verfügung. Bei den Zellen kann es sich beispielsweise um primäre Zellen aus dem Körper eines Patienten handeln, die zum Zwecke einer genetischen Therapie mit geeigneter DNA transfiziert werden sollen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an die Elektroden 3, 4 wird dann im Innenraum 2 ein geeignetes elektrisches Feld erzeugt, durch welches die DNA effektiv in die Zellen, insbesondere direkt in den Zellkern, eingebracht werden kann.

Figur 1c zeigt die erfindungsgemäße Vorrichtung gemäß Figur 1b nach der elektrischen Behandlung des biologischen Materials beim Durchspülen des Innenraums 2 der Kammer 1. Es wird hier deutlich, dass die Wandung 17 des Behältnisses 9 aus einem elastischen und deformierbaren Material, beispielsweise einem elastischen Kunststoff, besteht. Durch Ausüben von Druck auf die Wandung 17 entlang der Richtung des Pfeils 18 wird die Wandung 17 deformiert und somit ein Druck auf die Lösung 10 im Inneren des Behältnisses 9 ausgeübt.

Durch diesen Druck kann die Trenneinheit 11 zwischen dem Behälter 9 und der Kammer 1 geöffnet werden. Alternativ kann die Trenneinheit 11 aber auch durch eine andersartige Manipulation von außen geöffnet werden. Hierdurch gelangt die Lösung 10 durch die Zuleitung 7 in den Innenraum 2 der Kammer 1. Da die Öffnung 8 der Zuleitung 7 in der Nähe der hier nicht dargestellten Elektroden 3, 4 angeordnet ist, werden insbesondere die Elektroden 3, 4 intensiv von der Lösung 10 mit hoher Fließgeschwindigkeit umspült. Dabei kann durch den ausgeübten Druck auf die Wandung 17 die Fließgeschwindigkeit gezielt erhöht werden. Um Totvolumina im Innenraum 2 zu vermeiden, ist die innere Oberfläche der Kammerwand 19 abgerundet ausgeformt, so dass ein optimales Durchspülen des Innenraums 2 ermöglicht wird. Auf diese Weise können die behandelten Zellen nahezu vollständig in der Lösung 10 suspendiert werden. Durch die Anordnung der Öffnung 8 in der Nähe beider Elektroden 3, 4 werden diese gleichmäßig gespült, wobei bei geringem Abstand zwischen den beiden Elektroden Verwirbelungen entstehen, die sich vorteilhaft auf den Spülvorgang auswirken. In alternativer Ausgestaltung kann die Öffnung aber auch näher an einer Elektrode liegen, bei der es sich dann vorzugsweise um die Kathode handelt. Aufgrund der besonders vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden also auch an den Wänden und Elektroden anheftende Zellen abgelöst, wobei ein Suspendieren der Zellen auch bei durch hohe Feldstärken verursachter Schaumbildung gewährleistet ist.

Figur 1d zeigt die erfindungsgemäße Vorrichtung gemäß Figur 1b nach dem Durchspülen des Innenraums 2 der Kammer 1 mit der Lösung 10. Durch Drehen der Vorrichtung um 180 Grad kann nunmehr die Lösung 10 mit den suspendierten behandelten Zellen vom Innenraum 2 über die Trenneinheit 5 in den Behälter 12 gelangen. Dieser Zustand ist in Figur 1e dargestellt. Alternativ kann das Drehen der erfindungsgemäßen Vorrichtung um 180 Grad auch bereits vor dem Spülvorgang erfolgen, wobei dann ein etwas höherer Druck auf die Lösung 10 ausgeübt werden muss, damit diese entgegen der Schwerkraft zunächst in den

Innenraum 2 der Kammer 1 gedrückt werden kann. Wenn die Trenneinheit 5 wie im dargestellten Beispiel aus einer Filtereinheit besteht, können größere Partikel im Innenraum 2 zurückgehalten werden, so dass ggf. störende Einflüsse auf die behandelte Zellsuspension vermieden werden. Der Behälter 12 weist wie die Kammer 1 ebenfalls einen perforierbaren Wandbereich 20 auf, über den die Zellsuspension mittels einer Spritze 21 aus dem Inneren des Behälters 12 entnommen werden kann. Dabei ist die Trichterform des Behälters 12 von Vorteil, da die mit der Zeit sedimentierenden Zellen sich im unteren Bereich konzentrieren und somit auch in konzentrierter Form entnommen werden können. Die sterile Suspension mit den behandelten Zellen kann also auf diese Weise einem Patienten schnell, in konzentrierter Form und auf einfache Weise appliziert werden.

Figur 2 zeigt eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in zwei geschnittenen Darstellungen, die jeweils zueinander um 90 Grad gedreht sind. Die dargestellte Vorrichtung besteht aus einer Kammer 25 mit einem Innenraum 26, der eine Zellsuspension 27 und/oder biologisch aktive Moleküle in gelöster Form enthält. Die Kammer weist ferner zwei flache Elektroden 28, 29 mit planer Oberfläche auf, welche parallel zueinander an gegenüberliegenden Seitenwänden der Kammer 25 angeordnet sind. In der Darstellung gemäß Figur 2a ist dabei nur die hinter der Schnittebene angeordnete Elektrode 28 sichtbar. Die Kammer 25 weist zwei Anschlussvorrichtungen 30, 31 auf, die an gegenüberliegenden Enden der Kammer 25 angeordnet sind. Das Einbringen der Zellsuspension 27 erfolgt über die Anschlussvorrichtung 31 vorzugsweise aus einem Behälter, dessen Kanüle eine Länge aufweist, die ungefähr der Stärke der Anschlussvorrichtung 31 entspricht, so dass im Innenraum 26 beim Einbringen der Zellen kein Totvolumen entsteht. Die Kanüle kann dabei eine Membran oder ähnliches durchstechen, welche den Innenraum 26 nach außen verschließt. An die Anschlussvorrichtung 30 ist ein Behältnis 32 anschließbar, wobei es sich bei dem Behältnis 32 beispielsweise um eine Spritze oder Ähnliches handeln kann. Das

Behältnis 32 kann auch elastisch verformbar sein, damit seine Wandung nachgiebig ist, wenn die Lösung in alternativer Ausgestaltung durch einen mittels des Behälters 40 im Innenraum 26 erzeugten Unterdruck aus dem Behältnis 32 herausgesaugt wird. Die Anschlussvorrichtung 30 weist eine Ausnehmung 34 auf, in welche die Kanüle 33 des Behältnisses 32 einführbar ist. Die Ausnehmung 34 kann dabei beispielsweise durch einen Stopfen verschließbar sein oder am Übergang zur Zuleitung 36 mit einem Ventil oder einer fragilen Membran verschlossen sein, das bzw. die von der Kanüle 33 durchstoichen wird. Auf diese Weise kann die in dem Behältnis 32 enthaltene Lösung 35 in die Zuleitung 36 der Kammer 25 eingebracht werden. Über die Öffnung 37 der Zuleitung 36 gelangt die Lösung 35 dann in den Innenraum 26, wobei die Elektrode 29 sehr intensiv von der Lösung 35 umspült wird. Vorteilhafterweise handelt es sich bei der Elektrode 29 um die Kathode, an die sich bei der Elektroporation von Zellen im besonderen Maße Zellmaterial anheftet und bei herkömmlichen Vorrichtungen nur schwer zu entfernen ist. Wie aus Figur 2a zu entnehmen ist, ist die innere Oberfläche 38 der Kammerwand 39 abgerundet ausgebildet, so dass keine Totvolumina entstehen. Auf diese Weise wird ein effektives Durchspülen des Innenraums 26 gewährleistet. Die mittels der Lösung 35 verdünnte Zellsuspension 27 wird dann in den Behälter 40 aufgenommen, so dass in einer Ausführungsform das Spülen und das Entnehmen der Zellen in zwei Schritten erfolgt. Alternativ kann die Lösung auch durch einen mittels des Behälters 40 im Innenraum 26 erzeugten Unterdruck aus dem Behältnis 32 durch den Innenraum 26 über die Elektroden 28, 29 in den Behälter 40 gesaugt werden, so dass Spülung und Entnahme hier in einem Schritt erfolgen. Die Kanüle 41 des Behälters 40, bei dem es sich beispielsweise um eine Spritze oder ähnliches handeln kann, wird wie bei der Anschlussvorrichtung 30 in eine Ausnehmung 42 der Anschlussvorrichtung 31 eingeführt. Bei den Anschlussvorrichtungen 30, 31 kann es sich beispielsweise auch um Luer-Anschlüsse handeln, an die auf bekannte Weise beispielsweise Spritzen oder Infusionsbeutel angeschlossen werden können. Die Anschlussvorrichtungen 30, 31 können aber beispielsweise auch perforierbare Gummistopfen sein.

Figur 3 zeigt eine Vorderansicht einer weiteren Ausführungsform der Erfindung in geschnittener Darstellung. Die dargestellte Vorrichtung besteht aus einer Kammer 45 mit einem Innenraum 46 und zwei planparallel angeordneten Elektroden 47, 48. Die Kammer 45 weist hier zwei Zuleitungen 49, 50 auf, die jeweils parallel zueinander in den Randbereichen der Kammer 45 angeordnet sind. Über die Zuleitungen 49, 50 kann eine Lösung zum Spülen des Innenraums 46 eingeleitet werden. Die Zuleitungen 49, 50 können aber beispielsweise auch für das Einbringen des biologischen Materials in den Innenraum 46 und anschließend für das Einleiten der Lösung verwendet werden. Die Zuleitungen werden über einen kanalförmigen Überlauf, d.h. den länglichen Überlaufkanal 59 gespeist, was nachfolgend unter Figur 4 näher erläutert wird. Zwischen den beiden Zuleitungen 49, 50 ist eine Ausgangsöffnung 51 angeordnet, über welche der Inhalt des Innenraums 46 der Kammer 45 wieder entnommen werden kann. Der Kammerinhalt strömt dabei in einen länglichen Ablaufkanal 60, der nachfolgend unter Figur 4 näher dargestellt ist. Zwischen dem Innenraum 46 und dem Ablaufkanal 60 ist hier eine Trennvorrichtung 61 angeordnet, bei der es sich beispielsweise um einen Membranfilter handeln kann.

Figur 4 zeigt eine Seitenansicht der Ausführungsform gemäß Figur 3 in geschnittener Darstellung. Es wird hier deutlich, dass die Kammer 45 langgestreckt ausgebildet ist, so dass sie zur Aufnahme größerer Volumina geeignet ist. Dabei verläuft die Elektrode 48, wie auch die hier nicht sichtbare Elektrode 47, bei geringer Höhe über die gesamte Länge der Kammer 45. Der Überlaufkanal 59 ist eingangsseitig mit einem Behälter verbindbar und leitet eine Lösung aus dem Behälter in die hier nicht sichtbaren Zuleitungen (Bezugsziffern 49 und 50 in Figur 3). Die Zuleitungen erstrecken sich spaltartig ebenfalls über die gesamte Länge der Kammer 45. Dabei weisen die Zuleitungen einen engeren Querschnitt als der Überlaufkanal 59 auf, so dass sich in den Zuleitungen ein über die gesamte Länge der Kammer 45 gleichmäßiger Druck aufbauen kann, wenn

der Überlaufkanal mit der Lösung gefüllt ist. Der parallel zum Überlaufkanal 59 verlaufende Ablaufkanal 60 ist ablaufseitig mit einem Behälter verbindbar, der das behandelte und durch die Lösung ausgespülte biologische Material aufnimmt.

Figur 5 zeigt eine weitere Alternative der Erfindung, die im wesentlichen der Vorrichtung gemäß den Figuren 3 und 4 entspricht, wobei hier aber nur eine Zuleitung 52 vorgesehen ist. Die Öffnung 53 der Zuleitung 52 ist hier in unmittelbarer Nähe der Elektrode 54 angeordnet, wobei es sich bei dieser vorzugsweise um die Kathode handelt. Die Zuleitung 52 wird hier durch den Kanal 62 mit der Lösung gespeist, wobei die Lösung mit dem behandelten Material durch die Trennvorrichtung 64 und den Kanal 62 wieder entnommen werden kann.

Figur 6 zeigt eine geschnittene Ansicht eines Teils einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit schlangenförmiger Kammer 55. Die Elektroden sind hier nicht dargestellt, können aber beispielsweise vor und hinter der Schnittebene angeordnet sein. Die Kammer 55 besteht aus einer kanalförmigen Zuleitung 56 und einer kanalförmigen Ableitung 57, welche jeweils an den Enden des schlangenförmigen Innenraums 58 angeordnet sind. Zuleitung 56 und Innenraum 58 weisen hier einen gleichförmigen, geringen Querschnitt auf, was zu einer hohen Fließgeschwindigkeit im Innenraum 58 und an den Oberflächen der hier nicht dargestellten Elektroden führt. Auf diese Weise kann die Kammer sehr effektiv und gründlich ausgespült werden. Dabei kann sich der innere Durchmesser der Zuleitung 56 in Richtung des Innenraums 58 verjüngen, so dass sich die Fließgeschwindigkeit der Lösung im Innenraum 58 erhöht.

Figur 7 zeigt eine weitere Ausführungsform der Erfindung, bei der die Kammer 65 u-förmig ausgebildet ist. Die hier nicht dargestellten Elektroden sind bei dieser Ausführungsform vor und hinter der Schnittebene angeordnet. Die Lösung wird über die Zuleitung 67 in den Innenraum 66 eingebracht, wobei aufgrund des geringen Querschnitts der Kammer 65 eine hohe Fließgeschwindigkeit erreicht

werden kann. Über die Ableitung 68 wird die Lösung mit dem behandelten biologischen Material aus der Kammer 65 gedrückt oder abgesaugt.

Figur 8 zeigt eine alternative Ausführungsform der Erfindung, die im wesentlichen der in Figur 7 dargestellten entspricht. Die Zuleitung 76 der Kammer 75 weist hier aber einen deutlich größeren Querschnitt als die Ableitung 77 auf, so dass hiermit größere Volumina verarbeitet werden können.

Bezugszeichenliste:

- | | |
|----|----------------------|
| 1 | Kammer |
| 2 | Innenraum |
| 3 | Elektrode |
| 4 | Elektrode |
| 5 | Filtereinheit |
| 6 | Pufferlösung |
| 7 | Zuleitung |
| 8 | Öffnung |
| 9 | Behältnis |
| 10 | Lösung |
| 11 | Trenneinheit |
| 12 | Behälter |
| 13 | Wandbereich |
| 14 | Kanüle |
| 15 | Spritze |
| 16 | Suspension |
| 17 | Wandung |
| 18 | Pfeil |
| 19 | Kammerwand |
| 20 | Wandbereich |
| 21 | Spritze |
| 22 | Pfeil |
| 25 | Kammer |
| 26 | Innenraum |
| 27 | Suspension |
| 28 | Elektrode |
| 29 | Elektrode |
| 30 | Anschlussvorrichtung |

31	Anschlussvorrichtung
32	Behältnis
33	Kanüle
34	Ausnehmung
35	Lösung
36	Zuleitung
37	Öffnung
38	Oberfläche
39	Kammerwand
40	Behälter
41	Kanüle
42	Ausnehmung
45	Kammer
46	Innenraum
47	Elektrode
48	Elektrode
49	Zuleitung
50	Zuleitung
51	Ausgangsöffnung
52	Zuleitung
53	Öffnung
54	Elektrode
55	Kammer
56	Zuleitung
57	Ableitung
58	Innenraum
59	Überlaufkanal
60	Ablaufkanal
61	Trennvorrichtung
62	Kanal

- 63 Kanal
- 64 Trennvorrichtung
- 65 Kammer
- 66 Innenraum
- 67 Zuleitung
- 68 Ableitung
- 75 Kammer
- 76 Zuleitung
- 77 Ableitung

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Behandlung von biologischem Material, zumindest bestehend aus einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer mit einem Innenraum zur Aufnahme des biologischen Materials, wobei die Kammer zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest eine Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) aufweist, welche in räumlicher Nähe zu der Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) mindestens eine Öffnung (8, 37, 53) aufweist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) kanalförmig ausgebildet ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sich der innere Durchmesser der Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) in Richtung der Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) verringert.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein durch eine Wandung (17) gebildetes Behältnis (9, 32) zur Aufnahme einer Lösung über die Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) mit dem Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) zumindest verbindbar ist.
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und das Behältnis (9, 32) durch eine Trenneinheit (11) voneinander getrennt sind, durch welche die Lösung selektiv in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) einbringbar ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Trenneinheit (11) ein Ventil ist oder dass die Trenneinheit (11) eine fragile Membran ist, die unter Druck zerstörbar ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) nach außen zumindest keimdicht verschlossen ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die das Behältnis (9, 32) bildende Wandung (17) zumindest teilweise aus einem elastischen und/oder deformierbaren Material besteht.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis (9, 32) an die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest anschließbar ist, beispielsweise einstückig mit dieser verbunden oder über eine Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) anschließbar ist.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und das Behältnis (9, 32) eine nach außen zumindest keimdicht verschlossene Einheit bilden.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle (14, 33, 41), perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) aufweist und/oder mit zumindest einem Zugang mit einer Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) einen geringen Querschnitt aufweist und/oder schlangenförmig und/oder spiralförmig ausgebildet ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) durch mindestens eine Trenneinrichtung in mehrere Teilbereiche unterteilt ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Trenneinrichtung aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit (5) besteht.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein Behälter (12, 40) an eine Ausgangsöffnung (51) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest anschließbar ist, beispielsweise einstückig mit dieser verbunden oder über eine Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) anschließbar ist.
16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und dem Behälter (12, 40) eine Trennvorrichtung (61, 64) angeordnet ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennvorrichtung (61, 64) aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit (5) besteht.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (12, 40) zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle (14, 33, 41), perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) aufweist und/oder mit zumindest einem Ausgang mit einer

Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen ist.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (12, 40) eine Spritze oder ein Infusionsbeutel ist.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (12, 40) und die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) eine nach außen keimdicht verschlossene Einheit bilden.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der perforierbare, selbstverschließende Wandbereich (13, 20) aus einem Kunststoffmaterial, beispielsweise einem Silicon, einem Elastomer oder Gummi, besteht.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zwei gegenüberliegende Elektroden (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) aufweist, die jeweils mit dem Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) in Kontakt stehen, oder dass eine weitere Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) einführbar ist.
23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) oder die Elektroden (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial, vorzugsweise einem mit einem leitfähigen Material dotierten Kunststoff, besteht.
24. Verfahren zur Behandlung von biologischem Material, bei dem das biologische Material in den Innenraum einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer eingebracht wird, welche zumindest eine

- Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist, welches nach dem Einbringen des biologischen Materials in dem Innenraum erzeugt wird durch Anlegen einer Spannung an die Elektrode und eine weitere mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt stehende Elektrode, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach dem Erzeugen des elektrischen Feldes das biologische Material mittels einer Lösung, die über eine Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) an zumindest einer Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) entlang geleitet wird, annähernd vollständig aus dem Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) ausgespült wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung mit hoher Fließgeschwindigkeit an der Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) entlang geleitet wird.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung an der Kathode entlang geleitet wird.
27. Verfahren nach Anspruch 24, 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) eingebracht wird.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 27, gekennzeichnet durch das Öffnen einer Trenneinheit (11) durch mechanische Manipulation von außen, wobei die Trenneinheit (11) den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) von einem die Lösung enthaltenden Behältnis (9, 32)

trennt, welches durch die Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) mit der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) verbindbar oder verbunden ist.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Trenneinheit (11) ein Ventil ist, welches durch die mechanische Manipulation von außen zumindest in eine Richtung geöffnet wird, oder dass die Trenneinheit (11) eine fragile Membran ist, die durch von außen ausgeübten Druck zerstört wird.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 29, gekennzeichnet durch das Aufnehmen des biologischen Materials und der Lösung in einem Behälter (12, 40), der an eine Ausgangsöffnung (51) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest anschließbar ist.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass ein die Lösung enthaltendes Behältnis (9, 32) zumindest teilweise durch eine elastische und/oder deformierbare Wandung (17) gebildet ist und auf diese Wandung (17) von außen ein Druck ausgeübt wird.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material durch eine zwischen der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und dem Behälter (12, 40) angeordnete Trennvorrichtung (61, 64), insbesondere ein Ventil und/oder eine Filtereinheit (5), in den Behälter (12, 40) gespült wird.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass das behandelte biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) des Behälter (12, 40)s aus diesem entnommen wird.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material lebende Zellen, vorzugsweise eukaryontische Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel sind, in welche durch das Erzeugen des elektrischen Feldes biologisch aktive Moleküle, vorzugsweise Nukleinsäuren, eingebracht werden, oder die durch das Erzeugen des elektrischen Feldes fusioniert werden.
35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die biologisch aktiven Moleküle in einer Pufferlösung gelöst sind und vor dem Einbringen des biologischen Materials in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) eingebracht werden.
36. Verfahren nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in lebende Zellen mit einer Stromdichte von bis zu 120 A/cm^2 , vorzugsweise 80 A/cm^2 , und/oder durch einen Spannungsimpuls mit einer Feldstärke von 2 bis 10 kV*cm^{-1} und einer Dauer von 10 bis $200 \mu\text{s}$ erreicht wird.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in die Zellen durch einen auf den Spannungsimpuls ohne Unterbrechung folgenden Stromfluss mit einer Stromdichte von 2 bis 14 A/cm^2 , vorzugsweise 5 A/cm^2 , und einer Dauer von 1 bis 100 ms, vorzugsweise 50 ms, erreicht wird.

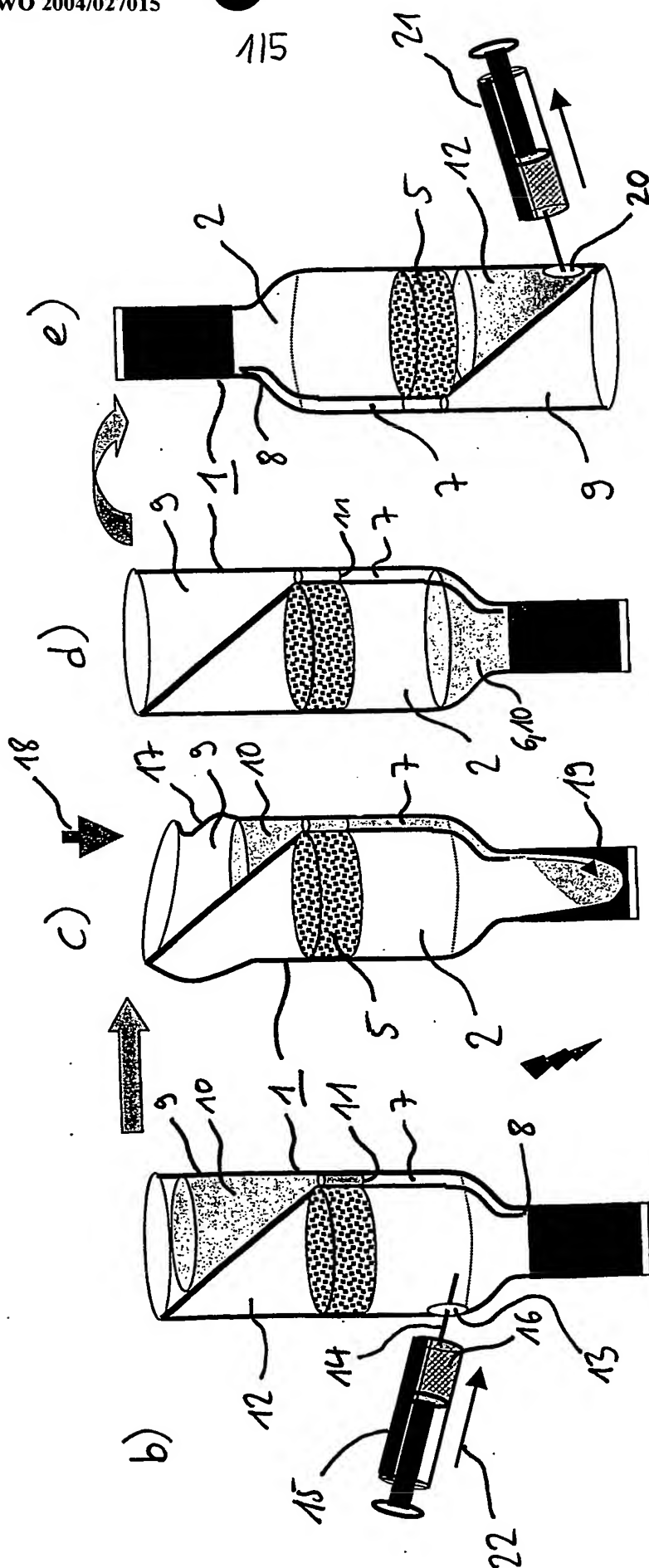


Fig. 1

2/5

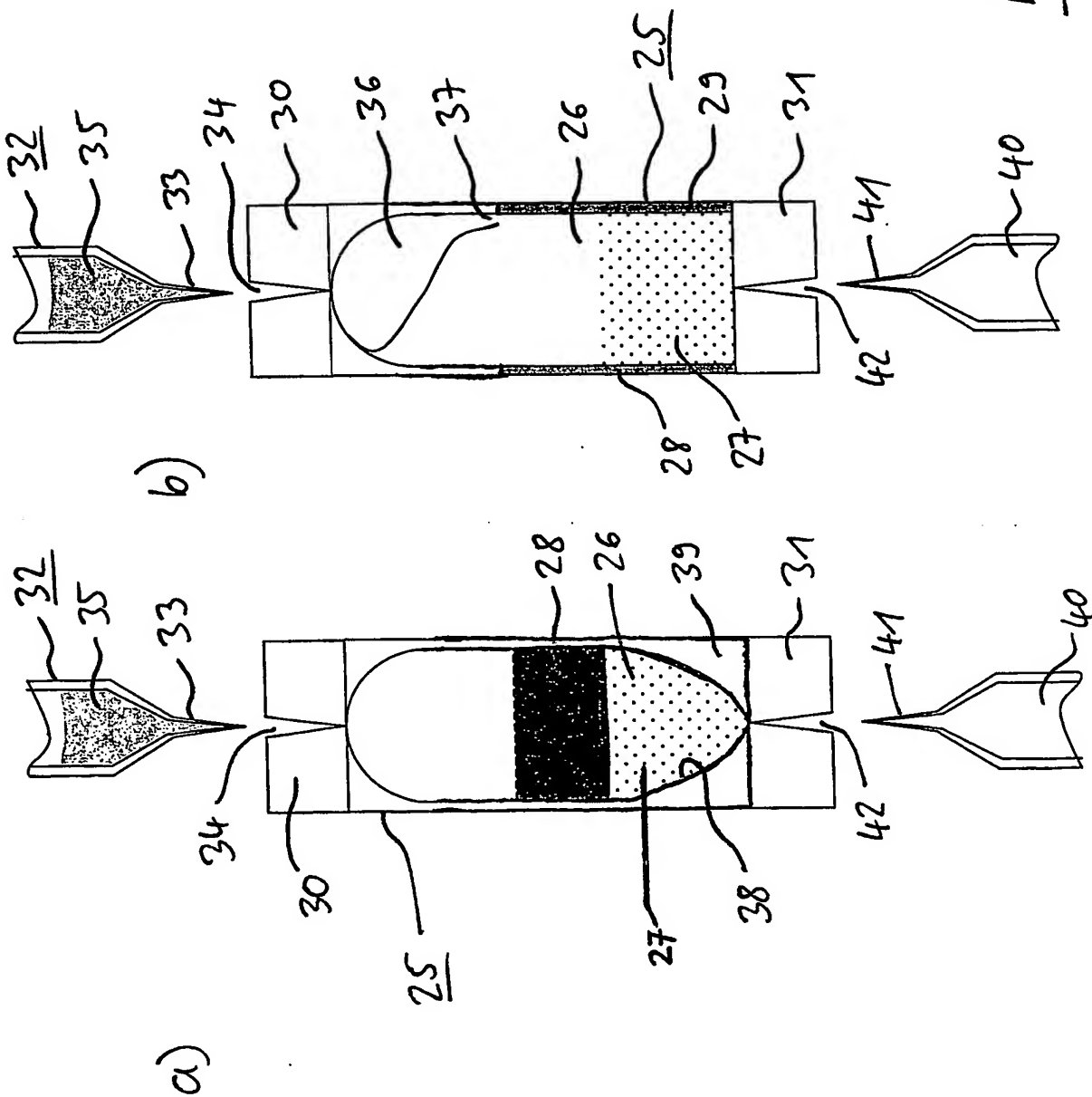


Fig. 2

Fig. 4

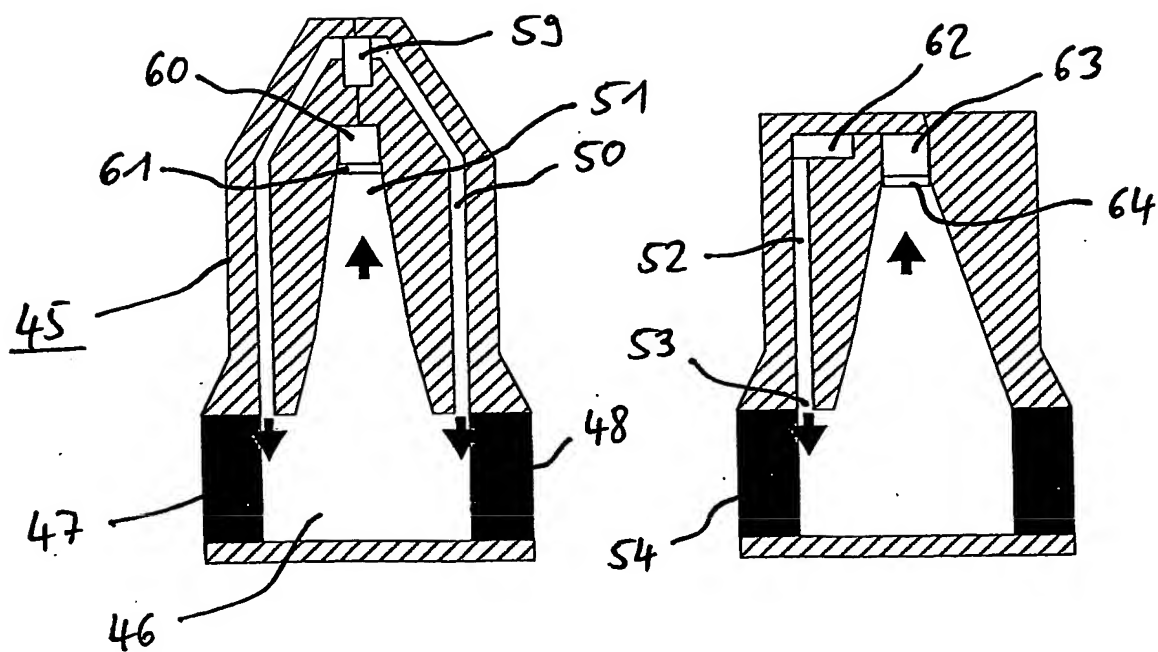
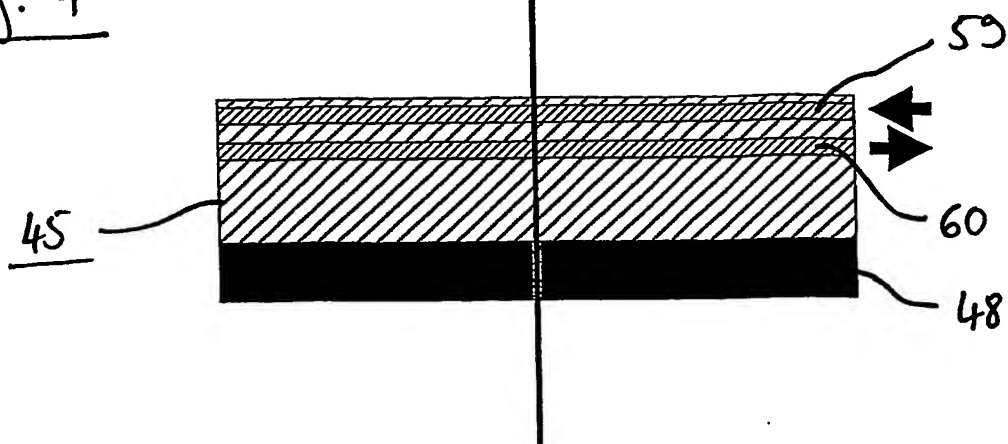


Fig. 3

Fig. 5

415

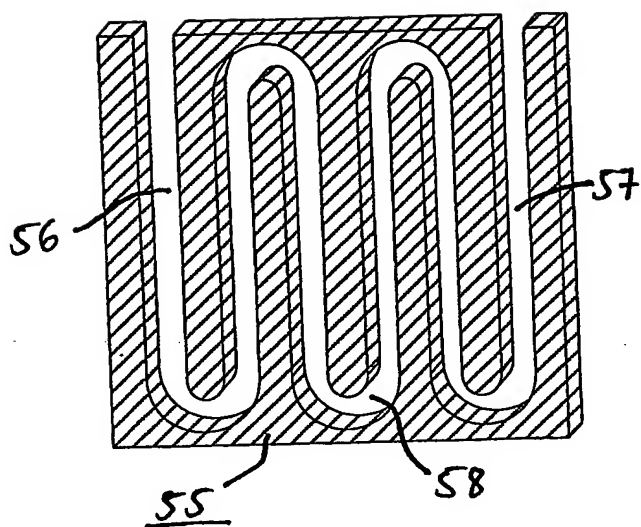


Fig. 6

515

Fig. 7

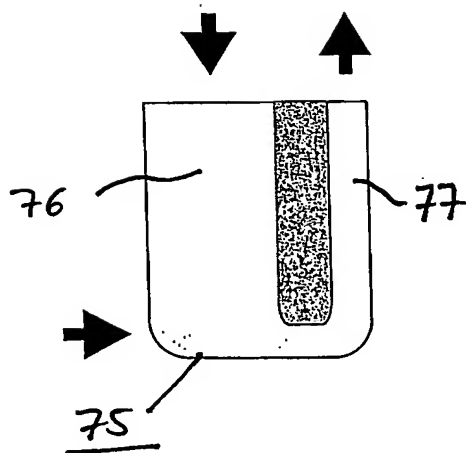
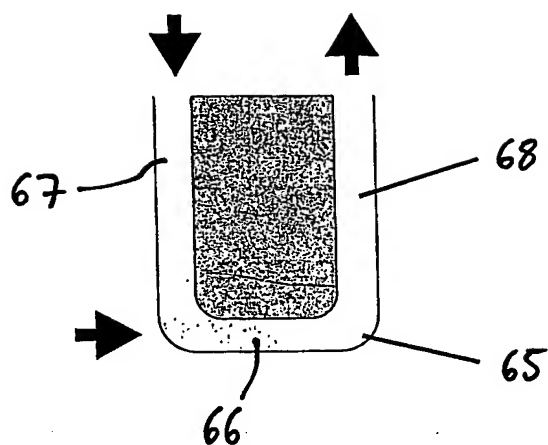


Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 03/03042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12M1/42 C12N13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C12N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 441 972 A (POHL HERBERT A) 10 April 1984 (1984-04-10)	1,2,4,9, 12,15, 22, 24-26,30 23
Y	the whole document	
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 0122, no. 70 (C-515), 27 July 1988 (1988-07-27) & JP 63 049070 A (SHIMADZU CORP), 1 March 1988 (1988-03-01)	1-4,9, 12,15, 19,22, 24-26, 30,34,35 23
Y	abstract	
	----- -/-- -----	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2004

Date of mailing of the international search report

16/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No
PCT/DE 93/03042

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 849 089 A (MARSHALL III JOHN) 18 July 1989 (1989-07-18) cited in the application	1,2,4,9, 10,15, 19,20
Y	the whole document	7,11,18, 21,23, 27,33
Y	EP 0 128 566 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 19 December 1984 (1984-12-19) cited in the application the whole document	7,11,18, 21,23, 27,33
P,Y	US 2002/164776 A1 (BEICHMANN BORIS V ET AL) 7 November 2002 (2002-11-07) claim 12	23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

indicate patent family members

International Application No

PCT/DE 03/03042

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4441972	A	10-04-1984	US 4476004 A	09-10-1984
JP 63049070	A	01-03-1988	NONE	
US 4849089	A	18-07-1989	US 4946793 A	07-08-1990
			AU 7433787 A	01-12-1987
			EP 0266418 A1	11-05-1988
			US 4906576 A	06-03-1990
			WO 8706851 A1	19-11-1987
			US 4923814 A	08-05-1990
EP 0128566	A	19-12-1984	DE 3321239 A1	13-12-1984
			EP 0128566 A2	19-12-1984
			JP 60012969 A	23-01-1985
US 2002164776	A1	07-11-2002	DE 10116211 A1	10-10-2002
			EP 1245669 A1	02-10-2002
			JP 2002306156 A	22-10-2002

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internat. Zeichen

PCT/DE 03/03042

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12M1/42 C12N13/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 441 972 A (POHL HERBERT A) 10. April 1984 (1984-04-10)	1,2,4,9, 12,15, 22, 24-26,30 23
Y	das ganze Dokument	
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 0122, Nr. 70 (C-515), 27. Juli 1988 (1988-07-27) & JP 63 049070 A (SHIMADZU CORP), 1. März 1988 (1988-03-01)	1-4,9, 12,15, 19,22, 24-26, 30,34,35 23
Y	Zusammenfassung	
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Februar 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/02/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van der Schaal, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 849 089 A (MARSHALL III JOHN) 18. Juli 1989 (1989-07-18) in der Anmeldung erwähnt	1,2,4,9, 10,15, 19,20
Y	das ganze Dokument	7,11,18, 21,23, 27,33
Y	----- EP 0 128 566 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 19. Dezember 1984 (1984-12-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	7,11,18, 21,23, 27,33
P,Y	----- US 2002/164776 A1 (BEICHMANN BORIS V ET AL) 7. November 2002 (2002-11-07) Anspruch 12 -----	23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu dieser Patentfamilie gehören

Internationaler Patentantrag

PCT/DE 03/03042

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4441972	A	10-04-1984	US 4476004 A	09-10-1984
JP 63049070	A	01-03-1988	KEINE	
US 4849089	A	18-07-1989	US 4946793 A	07-08-1990
			AU 7433787 A	01-12-1987
			EP 0266418 A1	11-05-1988
			US 4906576 A	06-03-1990
			WO 8706851 A1	19-11-1987
			US 4923814 A	08-05-1990
EP 0128566	A	19-12-1984	DE 3321239 A1	13-12-1984
			EP 0128566 A2	19-12-1984
			JP 60012969 A	23-01-1985
US 2002164776	A1	07-11-2002	DE 10116211 A1	10-10-2002
			EP 1245669 A1	02-10-2002
			JP 2002306156 A	22-10-2002